

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Συγκριτική μελέτη των βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ μεσεντέρου  
και οπισθεντέρου σε άτομα *Nephrops norvegicus* από τον Παγασητικό  
Κόλπο»**

**Σακκομήτρου Μαρία**

**ΒΟΛΟΣ 2010**

**«Συγκριτική μελέτη των βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ μεσεντέρου και  
οπισθεντέρου σε άτομα *Nephrops norvegicus* από τον Παγασητικό Κόλπο»**



**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

**1) Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδάτινης Στήλης με Έμφαση στα Μικροβιακά και Τροφικά Είδη, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***,

**2) Έλενα Μεντέ**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Φυσιολογία και Θρέψη Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***,

**3) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης**, Λέκτορας, Διατροφή Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

*Στους γονείς μου,  
Βάσω και Κων/νο και  
στην αδερφή μου, Λαμπρινή*



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον κ. Κορμά Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Καραπαναγιωτίδη και κ. Μεντέ, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Μεζίτη Αλεξάνδρα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, κατά την διάρκεια του πειράματος, καθώς επίσης για τις χρήσιμες συμβουλές της για την συγγραφή της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους συμφοιτητές μου Βασιλική Κεφεκέ, Κων/νο Κρούπη και Ζήση Πετμεζά για την αμέριστη κατανόηση και βοήθεια κατά την διάρκεια του πειράματος και των φοιτητικών μας χρόνων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η μοριακή ποικιλότητα βακτηρίων στο έντερο της караβίδας *Nephrops norvegicus* με στόχο την διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της караβίδας με τους συμβιώτες της και το περιβάλλον. Η караβίδα *Nephrops norvegicus* είναι ένα δεκάποδο καρκινοειδές της οικογένειας Nephropidae, το οποίο κατανέμεται στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, από το Μαρόκο μέχρι τη Νορβηγία και την Ισλανδία, καθώς και στη Μεσόγειο θάλασσα. Συλλέχθηκαν δείγματα του είδους *Nephrops norvegicus* από τον φυσικό πληθυσμό του Παγασητικού Κόλπου. Το έντερο της караβίδας χωρίστηκε σε δύο τμήματα, το μεσαίο και το οπίσθιο μέρος. Απομονώθηκε το DNA από τα δύο τμήματα του εντέρου της караβίδας και στην συνέχεια ενισχύθηκαν με ειδικούς εκκινητές για βακτήρια τα 16S rDNA γονίδια των προκαρυωτικών οργανισμών με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Στην συνέχεια έγινε κλωνοποίηση των γονιδίων και δημιουργία βιβλιοθήκης με τα γονίδια διαφορετικών φυλοτύπων. Έγινε ανάλυση των αλληλουχιών που προέκυψαν και στη συνέχεια έγινε σύγκριση με αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων της GENBANK μέσω της λειτουργίας BLAST με στόχο να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς φυλότυποι. Τέλος πραγματοποιήθηκε η κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με την βοήθεια του προγράμματος MEGA4. Στο δείγμα από το μεσέντερο της караβίδας εντοπίστηκαν αντιπρόσωποι από τα υπό-φυλα των β-, γ- και δ- Proteobacteria καθώς και από τα φύλα των Bacteroidetes, Tenericutes και Actinobacteria, με τους αντιπροσώπους των γ- και δ- Proteobacteria να επικρατούν σε ποσοστά 38,8 και 22,1 % αντίστοιχα. Τα γ-Proteobacteria εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό (38,8%), τα οποία απαντώνται σε ενδιαιτήματα όπως είναι η υδάτινη στήλη, αλλά και σαν συμβιώτες στα θαλάσσια ασπόνδυλα. Επίσης πρέπει να τονισθεί το



γεγονός ότι στο μεσαίο μέρος του εντέρου βρέθηκε και το ακαλλιέργητο βακτήριο Se3-204 που ανήκει στους Mollicutes. Το ακαλλιέργητο βακτήριο Se3-204 είχε βρεθεί και στο παρελθόν σε δείγματα από καραβίδα που είχε αλιευτεί από τον Παγασητικό Κόλπο. Στο δείγμα από το οπισθέντερο εντοπίστηκαν αντιπρόσωποι από τα υπό-φύλα των α-, δ- και ε- Proteobacteria καθώς και από τα φύλα των Bacteroidetes και Spirochaetes, με τους αντιπροσώπους των δ- και α- Proteobacteria να επικρατούν σε ποσοστά 50% και 25% αντίστοιχα. Σε αντίθεση με το μεσέντερο, στο οπίσθιο μέρος του εντέρου τα δ- Proteobacteria εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό 50% σε σχέση με τους υπόλοιπους αντιπροσώπους. Η παρουσία των χημειοργανότροφων βακτηρίων στο έντερο της καραβίδας μπορεί να εμπλέκεται στη διάσπαση της οργανικής ύλης και στην παροχή εναλλακτικών πηγών άνθρακα στην καραβίδα.

**Λέξεις κλειδιά:** *Nephrops norvegicus*, συμβίωση, μεσέντερο, οπισθέντερο

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικές πληροφορίες για το είδος που μελετήθηκε.....	1
1.2 Ο εντερικός ιστός των καρκινοειδών και οι λειτουργίες του .....	4
1.3 Ο όρος «συμβίωση» στην επιστήμη της Βιολογίας .....	6
1.4 Συμβίωση βακτηρίων.....	7

### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....9

2.1 Συλλογή πειραματόζωων .....	10
2.2 Απομόνωση μεσέντερου και οπισθέντερου.....	10
2.3 Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) .....	10
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	10
2.5 Καθαρισμός του προϊόντος της PCR και απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης .....	12
2.6 Κλωνοποίηση .....	13
2.7 Επεξεργασία και έλεγχος των αποικιών μετά την κλωνοποίηση .....	14
2.8 Υγρές καλλιέργειες .....	14
2.9 Απομόνωση πλασμιδίου .....	15
2.10 Αλληλούχιση .....	15
2.11 Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου.....	16

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....18

### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....29

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....35

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>39</b>
----------------------	-----------

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικές πληροφορίες για το είδος που μελετήθηκε

Η караβίδα *Nephrops norvegicus* (Εικ. 1) ανήκει στην οικογένεια Nephropidae. Το *N. norvegicus* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εμπορικά είδη των Ευρωπαϊκών και Ελληνικών θαλασσών, συμπεριλαμβανομένου του Παγασητικού Κόλπου (Smith & Papadopoulou 2007). Η συστηματική κατάταξη του είδους παρατίθεται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Συστηματική κατάταξη της караβίδας *Nephrops norvegicus*.

Βασίλειο:	Animalia
Φύλο:	Arthropoda
Υπόφυλο:	Crustacea
Κλάση:	Malacostraca
Τάξη:	Decapoda
Υπόταξη:	Astacidea
Οικογένεια:	Nephropidae



**Εικόνα 1.** Καραβίδα *N. norvegicus* (Hillewaert 2006).

Το *N. norvegicus* κατανέμεται στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, από το Μαρόκο μέχρι τη Νορβηγία και την Ισλανδία, καθώς και στη Μεσόγειο θάλασσα (Fisher *et al.* 1987 & Relini *et al.* 1999). Είναι ευρέως διαδεδομένη στο Β.Α. Ατλαντικό, κατά μήκος των ακτών της δυτικής Ευρώπης και μέχρι την Μεσόγειο Θάλασσα (Εικ. 2) (Bjornsson & Dombaxe 2004).

Η καραβίδα είναι ένα μακρόβιο είδος με κανιβαλικές τάσεις, το οποίο ζει σε σχετικά υψηλά επίπεδα αλατότητας (Harris & Ulmestrand 2004). Χαρακτηρίζεται από αργή ανάπτυξη και μικρό ρυθμό θνησιμότητας (Abello *et al.* 2002).



**Εικόνα 2.** Γεωγραφική κατανομή του *N. norvegicus* (FAO Fisheries and Aquaculture Department).

Το σώμα του *N. norvegicus* είναι μεσαίου μεγέθους, το οποίο καλύπτεται από σκληρό εξωσκελετό και φέρει δαγκάνες (Relini *et al.* 1999). Η κοιλιακή χώρα είναι επιμηκυσμένη και καταλήγει σε μια ουρά ελικοειδούς σχήματος που επιτρέπει στην καραβίδα να κολυμπάει. Ωστόσο, η συμπεριφορά του *N. norvegicus* είναι περισσότερο βαδιστική παρά κολυμβητική. Το *N. norvegicus* είναι χρώματος πορτοκαλί με πορτοκαλί-κόκκινες λωρίδες στις δαγκάνες και στο ανώτερο μέρος του κεφαλοθώρακα. Το μέγεθος του είναι 18-20 cm αν και μπορεί να φτάσει σε ολικό μήκος μέχρι και τα 25 cm. Διαθέτει πέντε ζεύγη άκρων (δεκάποδο) εκ των οποίων τα τρία πρώτα ζεύγη στις άκρες τους φέρουν δαγκάνες. Το πρώτο ζεύγος των δαγκανών είναι ιδιαίτερο μεγάλο με επιμήκεις ακανθώδεις κορυφές. Οι οφθαλμοί του *N. norvegicus* είναι μεγάλοι, μαύροι και μετακινούμενοι (Farmer 1975, Relini *et al.* 1999).

Το *N. norvegicus*, όπως και τα άλλα καρκινοειδή, αναπτύσσεται με μια μη διαδικασία, που παρουσιάζονται διαδοχικές αλλαγές στο κελύφους όπου διαχωρίζονται από τις ενδιάμεσες περιόδους. Κατά την διάρκεια της αλλαγής του εξωσκελετού, ο παλιός εξωσκελετός διαρρηγνύεται και το ζώο μεγαλώνει πολύ γρήγορα πριν ο καινούριος εξωσκελετός σκληρύνει. Στα νεαρά άτομα δεν έχει διαπιστωθεί περιοδικότητα στις αλλαγές του κελύφους, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι αλλάζουν κέλυφος καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Αντίθετα, στα ενήλικα άτομα παρατηρείται συγχρονισμός και συνήθως συμβαίνει μετά την εκκόλαψη των αυγών (Δεκέμβριος-Μάρτιος) (Gramitto 1998).

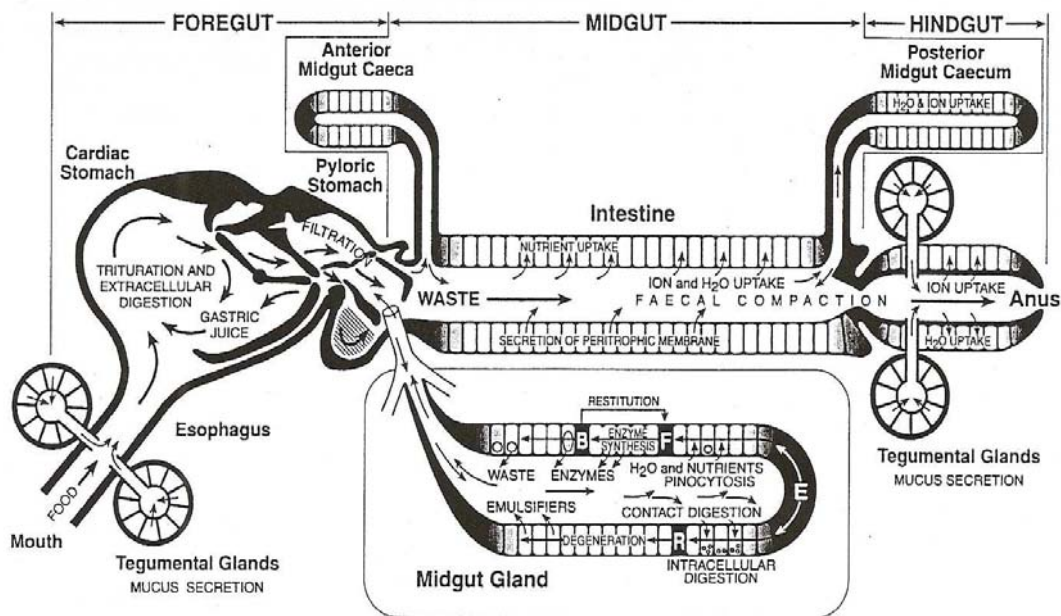
Το *N. norvegicus* είναι ένα γονοχωριστικό είδος, όπου τα αρσενικά άτομα είναι κατά βάση μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα θηλυκά (Mente *et al.* 2009). Έχει αναφερθεί ότι το μέγιστο μήκος σώματος που φτάνει το είδος είναι τα 24 cm, κατά καιρούς έχουν συλληφθεί και μεγαλύτερα άτομα, κυρίως στη βόρειο Αδριατική θάλασσα (Fisher *et al.* 1987). Στα κανάλια της Αδριατικής θάλασσας αλιεύτηκαν άτομα με συνολικό μήκος σώματος τα 26,5 cm (Crnkovic 1965). Το *N. norvegicus* τρέφεται κυρίως με άλλα μικρά δεκάποδα καρκινοειδή, πολύχαιτους, εχινόδερμα, ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς και ψάρια (Sarda & Valladares 1990, Cristo & Cartes 1998).

## **1.2 Ο εντερικός ιστός των καρκινοειδών και οι λειτουργίες του**

Στις караβίδες, το έντερο χωρίζεται σε τρία τμήματα: στο πρόσθιο, στο μεσαίο (μεσέντερο) και στο οπίσθιο τμήμα (οπισθέντερο) (Εικ. 3) (Conklin 1995). Το μεσαίο τμήμα (μεσέντερο) είναι η κεντρική περιοχή του εντέρου. Εκτείνεται από το μέσο του κεφαλοθώρακα, κατά μήκος της κοιλιακής περιοχής έως την αρχή του οπισθέντερου, το

οποίο βρίσκεται σε μικρή απόσταση από την έδρα. Ο Yonge περιέγραψε το πεπτικό σύστημα του *N. norvegicus*. Το μεσέντερο του είναι ένας στενός σωλήνας με λεπτά τοιχώματα, πλούσιο σε αιμοφόρα αγγεία. Το μεσέντερο αποτελεί το κύριο όργανο της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών του χυλού της τροφής μέσω των επιθηλιακών εντεροκυττάρων του. Συγκεκριμένα, το κύριο μέρος της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών του χυλού της τροφής εμφανίζεται στο άνω μέρος του μεσεντέρου. Η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών συμβαίνει σε πολύ μικρότερο βαθμό στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου, ενώ συνήθως δε συμβαίνει απορρόφηση στο τμήμα του οπισθέντερου (Yonge 1924).

Το οπισθέντερο εκτείνεται από το τέλος του μεσεντέρου μέχρι την έδρα. Το οπισθέντερο είναι μικρό σε έκταση και αποτελεί τη δίοδο για τα άπεπτα προϊόντα της τροφής προς την έδρα.



**Εικόνα 3:** Τα τμήματα του εντέρου και τις πιθανές λειτουργίες του (foregut: πρόσθιο τμήμα του εντέρου, midgut: μεσέντερο, hindgut: οπισθέντερο) (Conklin 1995).



### 1.3 Ο όρος «συμβίωση» στην επιστήμη της Βιολογίας

Στην επιστήμη της Βιολογίας, ο όρος «συμβίωση» χαρακτηρίζει τη συνύπαρξη δύο ή περισσότερων διαφορετικών οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικά είδη. Η συμβίωση μεταξύ των οργανισμών μπορεί να είναι μόνιμη ή να διαρκέσει ένα σύντομο χρονικό διάστημα. Η συμβίωση διαμορφώθηκε στην πορεία της ιστορικής εξέλιξης των οργανισμών ως ωφέλιμη γι' αυτούς μορφή σχέσεων. Κατά τη διάρκεια της συμβίωσης, ωφελούνται και οι δύο οργανισμοί, όπου παρατηρείται αμοιβαία χρησιμοποίηση των προϊόντων της ανταλλαγής της ύλης, προστασία του ενός οργανισμού από τον άλλο, παραχώρηση στέγης κ.λπ. (Paracer & Ahmadjian 2000). Στη συμβίωση, και οι δύο οργανισμοί ωφελούνται τόσο για την αύξηση όσο και για την επιβίωση τους και συνεπώς κανένας από τους δύο οργανισμούς δεν μπορεί να επιβιώσει χωρίς αυτού του είδους την αλληλεξάρτηση (Nair 2004).

Διαφορετικοί τύποι συμβίωσης που αναφέρονται είναι οι ακόλουθοι:

1. Αμοιβαία: είναι η περίπτωση συμβίωσης κατά την οποία επωφελούνται και οι δύο εμπλεκόμενοι οργανισμοί (π.χ. οι λειχήνες).
2. Μη επιβλαβής παρασιτισμός: στην περίπτωση αυτή ωφελείται ο ένας από τους δύο οργανισμούς (και καλείται «συμβιώτης»), ενώ ο ξενιστής ούτε ωφελείται, αλλά ούτε και βλάπτεται. (π.χ. ορισμένα είδη στρειδιών προσκολλούνται στο δέρμα των φαλαινών και έτσι εξασφαλίζουν τη διασπορά τους σε διάφορα ενδιαιτήματα και καλύτερης ποιότητας τροφή).
3. Παρασιτισμός: Είναι η περίπτωση εκείνη της συμβίωσης, όπου ο ένας οργανισμός (παράσιτο) τρέφεται από το σώμα του άλλου (ξενιστή) και τον ζημιώνει. Τα παράσιτα

βιώνουν κατά ένα μεγάλο μέρος της ζωής τους πάνω ή μέσα στον ξενιστή (π.χ. παθογόνοι) (Dimijian 2000).

Τα βακτήρια είναι από τους πιο γνωστούς μικροοργανισμούς που δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις. Η πιο γνωστή σχέση συμβίωσης είναι η λειχήνα, ένας σύνδεσμος από φύκη, κυανοβακτήρια και μύκητες. Ένα άλλο παράδειγμα είναι το πρωτόζωο *Mixotricha paradoxa*, το οποίο ζει στο έντερο του Αυστραλιανού τερμίτη *Mastotermes darwiniensis* αφομοιώνοντας το ξύλο που τρώει ο δεύτερος (Margulis 1981).

Η συμβίωση χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: την εκτοσυμβίωση και την ενδοσυμβίωση. Στην εκτοσυμβίωση, οι συμβιώτες ζουν στην επιφάνεια του σώματος του ξενιστή συμπεριλαμβάνοντας και την εσωτερική επιφάνεια του πεπτικού σωλήνα και του αδένα. Ένα παράδειγμα τέτοιου είδους συμβίωσης είναι τα θαλάσσια βενθικά ασπόνδυλα, όπως τα μαλάκια που συμβιώνουν με χημειοσυνθετικά βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούν ανόργανες ενώσεις ως πηγή ηλεκτρονίων. Αντίθετα στην ενδοσυμβίωση οι συμβιώτες ζουν μέσα στα κύτταρα του ξενιστή (Dimijian 2000).

#### 1.4 Συμβίωση βακτηρίων

Η παρουσία συμβιωτικών μικροοργανισμών στο πεπτικό σύστημα των ζωικών οργανισμών αποτελεί μία εναλλακτική πηγή διαιτητικού άνθρακα και ενέργειας στο ξενιστή τους (Mayer *et al.* 2001). Στο πεπτικό σύστημα των δεκαπόδων καρκινοειδών έχουν εντοπιστεί βακτήρια με πιθανή παραγωγή ενζύμων που δεν μπορεί να συνθέσει ο ξενιστής (Lau *et al.* 2002).

Κάποιες από τις μέχρι τώρα μελέτες για τη βακτηριακή ποικιλότητα στο πεπτικό σύστημα των καρκινοειδών έδειξαν ότι αυτή είναι μεγαλύτερη στο οπισθότερο σε

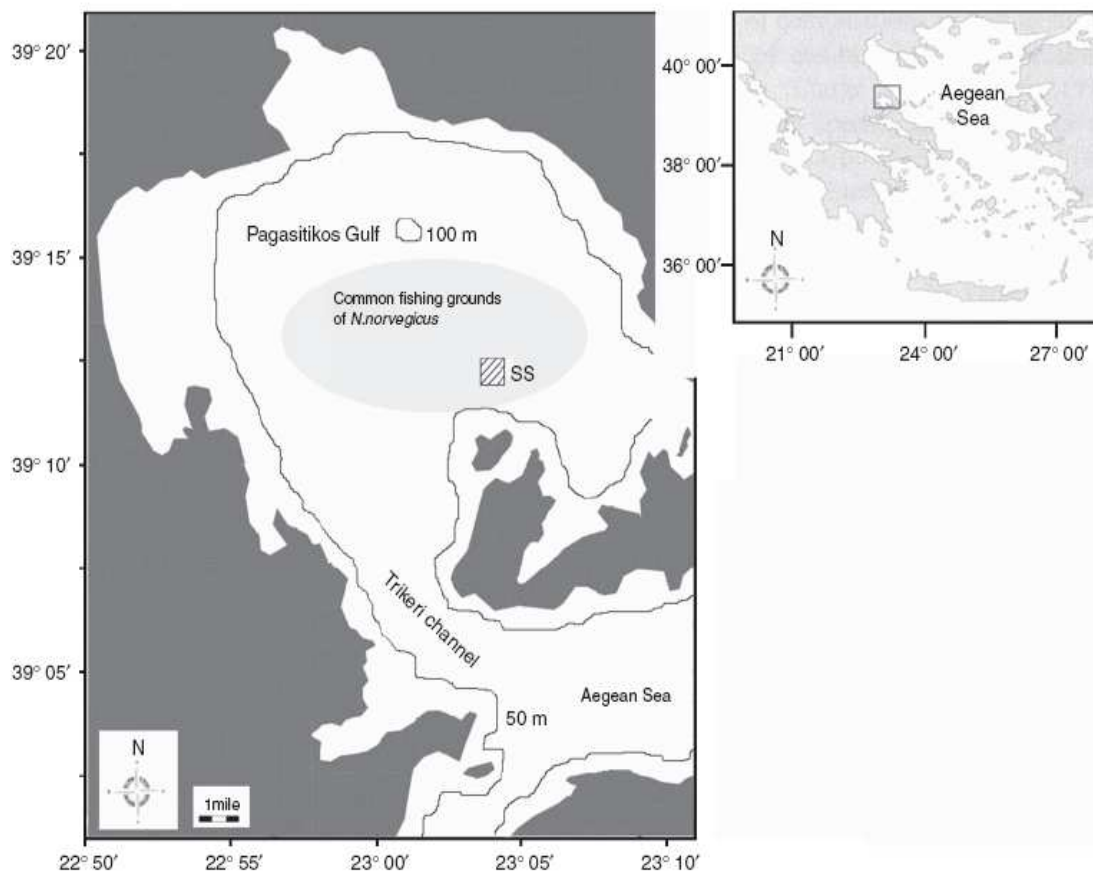
σχέση με το πρόσθιο τμήμα του εντέρου. Τα βακτήρια στο οπισθέντερο μπορούν να αναπτύσσονται σε συγκεκριμένες δομές και περιεχόμενα του εντέρου του ξενιστή, όπως είναι το στρώμα χιτίνης ή τα θρεπτικά συστατικά που έχει πέψει ο οργανισμός. Στην πραγματικότητα, τα βακτήρια δεν ανταγωνίζονται με τον οργανισμό για τα θρεπτικά συστατικά, αφού η απορρόφηση αυτών γίνεται στο μεσέντερο (Lau *et al.* 2002). Συνεπώς τα βακτήρια που αναπτύσσονται στο οπισθέντερο δεν έχουν μεγάλη προσφορά στην παροχή θρεπτικών συστατικών στο ξενιστή, ενώ τα βακτήρια του μεσέντερου, όπου πραγματοποιείται το μεγαλύτερο ποσοστό της απορρόφησης, έχουν τη δυνατότητα παροχής θρεπτικών συστατικών στον ξενιστή. Στο οπισθέντερο, τα βακτήρια μπορεί να εισέλθουν και από την έδρα και δε συμμετέχουν στην απορρόφηση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών (Lau *et al.* 2002). Μέχρι τώρα έχουν γίνει λιγοστές μελέτες για το πεπτικό σύστημα των καρκινοειδών και δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τη βακτηριακή ποικιλότητα στο έντερο των καρκινοειδών (Fenchel 1970, Baker & Bradnam 1976, Dempsey *et al.* 1989).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση και η σύγκριση των διαφορών βακτηριακών κοινοτήτων που απαντώνται στο μεσέντερο και στο οπισθέντερο της караβίδας (*Nephrops norvegicus*) και αν αυτές σχετίζονται με διεργασίες του πεπτικού συστήματος.

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συλλογή πειραματόζων

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα συλλέχθηκαν τον Απρίλιο του 2009 με τη βοήθεια αλιέα από τη θαλάσσια περιοχή του Παγασητικού Κόλπου (Εικ. 4). Για την αλιεία των καραβίδων χρησιμοποιήθηκαν ειδικές παγίδες με διαστάσεις 60 cm × 45 cm × 30 cm (μήκος × πλάτος × ύψος) και άνοιγμα ματιού 28 χιλιοστά. Το βάθος στο οποίο τοποθετήθηκαν οι παγίδες ήταν 85-90 m.



**Εικόνα 4.** Αλιευτικό πεδίο της καραβίδας *N. norvegicus* στον Παγασητικό κόλπο. Η σκιασμένη περιοχή αντιπροσωπεύει την περιοχή σύλληψης των πειραματόζων (Mente *et al.* 2009).

## **2.2 Απομόνωση μεσέντερου και οπισθέντερου**

Οι καραβίδες μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου με τη χρήση αποστειρωμένων εργαλείων απομονώθηκαν άμεσα το μεσέντερο και το οπισθέντερο, τα οποία εκκενώθηκαν από υπολείμματα τροφής πιέζοντας τον ιστό και ξεπλένοντας τον με αποστειρωμένο και διηθημένο θαλασσινό νερό. Τα δείγματα ιστού αποθηκεύθηκαν στην κατάψυξη ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) μέχρι την απομόνωση του DNA.

## **2.3 Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA)**

Η απομόνωση του DNA έγινε με μηχανική ρήξη και χρησιμοποιήθηκε το AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen USA). Το αρχικό βήμα για την απομόνωση ήταν η καλή ομογενοποίηση του ιστού. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του kit. Το DNA διαλύθηκε σε 100  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος του kit. Εξαιτίας της μικρής ποσότητας ιστού (κυρίως στο οπισθέντερο), η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποιημένα δείγματα μεσέντερου και οπισθέντερου από δύο άτομα καραβίδας με κωδικούς Arp1 (μεσέντερο) και Aph1 (οπισθέντερο), αντίστοιχα.

## **2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR )**

Το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είχε τη σύσταση που δίνεται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2.** Η ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου που χρησιμοποιήθηκε σε PCR ενός δείγματος.

Buffer (5x)	4 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 $\mu$ l
dNTPs (2,5 mM)	2 $\mu$ l
GM3 (100 $\mu$ M)	0,1 $\mu$ l
GM4 (100 $\mu$ M)	0,1 $\mu$ l
Δείγμα DNA	1 $\mu$ l
Taq (5 v/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
Νερό PCR	10,6 $\mu$ l
Σύνολο	20 $\mu$ l

Για την ενίσχυση των βακτηριακών 16S rRNA γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GM3 (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') και GM4 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Cardinale *et al.* 2004) οι οποίοι ενισχύουν ολόκληρο το βακτηριακό 16S rRNA γονίδιο (~ 1600 bp). Οι συνθήκες πραγματοποίησης της PCR φαίνονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις PCR που πραγματοποιήθηκαν

Προ-PCR	94 <sup>0</sup> C/1:00
(22-30) Κύκλοι	94 <sup>0</sup> C/0:45
	52,5 <sup>0</sup> C/0:45
	72 <sup>0</sup> C/2:00
Τελική επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C/10:00
Μετά-PCR	10 <sup>0</sup> C/∞

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πύκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 80V, 45 min. Για τη χρώση μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε στους 30 κύκλους, αλλά έγιναν και δοκιμές στους 22, 24, 26, 28, κύκλους, ώστε να έχουμε το επιθυμητό προϊόν σε όσο το δυνατό λιγότερους κύκλους.

## **2.5 Καθαρισμός του προϊόντος της PCR και απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης**

Για τον καθαρισμό του PCR προϊόντος χρησιμοποιήθηκε το Montage PCR kit (Millipore USA) ώστε να απομονώσουμε το προϊόν της PCR απαλλαγμένο από πρόσθετα στοιχεία (εκκινητές, νουκλεοτίδια). Με τον καθαρισμό του DNA αυξάνονται

οι πιθανότητες για καλύτερη απόδοση της κλωνοποίησης. Αρχικά έγινε μίξη των προϊόντων της PCR και προστέθηκε νερό σύμφωνα με τις οδηγίες του kit. Το τελικό προϊόν επαναραιώθηκε σε PCR νερό (25  $\mu$ l). Ακολουθήθηκαν τα βήματα του πρωτοκόλλου, όπου πραγματοποιήθηκε ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% στα 70V για 45 λεπτά. Το επόμενο στάδιο ήταν να απομονώσουμε τις ζώνες στις οποίες περιέχονται τα κομμάτια DNA με αποστειρωμένο νυστέρι και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του ο kit της Wizard gel purification (Promega ΗΠΑ).

## 2.6 Κλωνοποίηση

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που προέκυψαν από την PCR χρησιμοποιήθηκε το TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen ΗΠΑ). Στη διάρκεια της κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτροδεκτικά κύτταρα *Escherichia coli* και ακολουθήθηκαν αυστηρά οι οδηγίες του κατασκευαστή, με τη διαφορά ότι στο εργαστηριακό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν οι μισές από τις αναγραφόμενες αναλογίες. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκε PCR δείγμα 2  $\mu$ l, αραιωμένο άλας 0,5  $\mu$ l, πλασμίδιο 0,5  $\mu$ l, ώστε ο όγκος του τελικού δείγματος να είναι 3  $\mu$ l.

Το επόμενο βήμα ήταν η επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά ώστε να γίνει η ενσωμάτωση του γονιδίου στο πλασμίδιο και στη συνέχεια αναμίχθηκε με TOPO10 ηλεκτροδεκτικά κύτταρα του *E.coli*. Στη συνέχεια τα κύτταρα διεγέρθηκαν στα 1800V για 3,6 ms και προστέθηκε 250  $\mu$ l S.O.C. θρεπτικό μέσο. Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία, το μετασχηματισμένο προϊόν μεταφέρθηκε σε 1,5 ml eppendorf σωλήνα στον 37°C για 1 ώρα, ώστε να γίνει η επώαση και τα κύτταρα να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες.



Η επίστρωση έγινε σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB) με καναμυκίνη, με στόχο την ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων κυττάρων, αφού τα πλασμίδια περιέχουν ειδικό γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Στο τρυβλίο αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα που περιέχουν μόνο ανασυνδυασμένα πλασμίδια (Bernard *et al.* 1994). Η διαδικασία της επίστρωσης έγινε σε τρυβλία με 30  $\mu\text{L}$ , 60  $\mu\text{L}$  και 90  $\mu\text{L}$  κυττάρων.

## **2.7 Επεξεργασία και έλεγχος των αποικιών μετά την κλωνοποίηση**

Στο στάδιο αυτό, από τα τρυβλία της ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* έγινε η επιλογή των κλώνων. Οι κλώνοι μεταφέρθηκαν σε άλλα ειδικά αριθμημένα τρυβλία, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο σε υγρές καλλιέργειες.

## **2.8 Υγρές καλλιέργειες**

Χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB με καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 50  $\mu\text{g/ml}$ . Στο αυτόκαυστο αποστειρώθηκαν και τα γυάλινα σωληνάκια των 20  $\mu\text{L}$  περίπου, όπου διαμοιράστηκαν 8-10  $\mu\text{L}$  θρεπτικού μέσου που ετοιμάστηκαν για τις υγρές καλλιέργειες. Ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας εμβολιάστηκε με τις αποικίες σε ασηπτικές συνθήκες. Τα εμβολιασμένα σωληνάκια επωάστηκαν στους 37  $^{\circ}\text{C}$  σε αναδευτήρα για περίπου 18-22 ώρες.

## 2.9 Απομόνωση πλασμιδίου

Για την απομόνωση του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε το Plasmid DNA Purification, Nucleospin Plasmid QuickPure Kit (Machenery-Nagel Γερμανία) ώστε να ληφθούν τελικά καθαρά πλασμίδια. Ακολουθήθηκαν πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή. Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει την καθίζηση των βακτηρίων από τις υγρές καλλιέργειες με φυγοκέντρηση και την επαναιώρησή τους με ειδικό διάλυμα. Στην συνέχεια επιτυγχάνεται η απελευθέρωση του πλασμιδιακού DNA από το *E. coli* με λύση από αλκαλικό διάλυμα SDS. Μετά επιτυγχάνεται η ουδετεροποίηση του pH και η επίτευξη κατάλληλων συνθηκών, ώστε το πλασμιδιακό DNA να προσδεθεί στη μεμβράνη από το διοξείδιο του πυριτίου που διαθέτουν οι κολώνες του kit. Το υπόλειμμα των κυττάρων απομακρύνεται με φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο τοποθετείται στις ειδικά σχεδιασμένες κολώνες του kit. Ουσίες που δεν πρέπει να υπάρχουν όπως άλατα, μεταβολίτες, νουκλεάσες και άλλα μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά απομακρύνονται με απλό πλύσιμο με το ρυθμιστικό διάλυμα AQ. Με το διάλυμα AE (5 mM TrisCl, pH 8,5) που είναι ελαφρώς αλκαλικό παραλήφθηκε το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

## 2.10 Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση των γονιδίων έγινε με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς αγγείου σε συσκευή αλληλούχισης ABI 3700 (Applied Biosystems Inc ΗΠΑ) στην εταιρεία Macrogen (Κορέα). Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (M13R και M13F) του πλασμιδίου που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής του γονιδίου

στο πλασμίδιο. Για κάθε γονίδιο προέκυψαν δύο αλληλουχίες οι οποίες με συγκόλληση και επικάλυψη περίπου 100 βάσεις έδωσαν την τελική αλληλουχία του γονιδίου που είχε εισαχθεί.

## **2.11 Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου**

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν για κάθε γονίδιο συγκρίθηκαν με ήδη γνωστές αλληλουχίες της GENBANK με τη χρήση του προγράμματος BLAST, ώστε να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς με βάση την πρωτοταγή δομή των γονιδίων. Στη συνέχεια οι αλληλουχίες τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα MEGA4, όπου ακολούθησε η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με τους ήδη γνωστούς συγγενείς, επεξεργασία με την μέθοδο των αποστάσεων Neighbour-Joining, διόρθωση με τη μέθοδο Jukes Cantor και τέλος έγινε τοποθέτηση των αλληλουχιών σε φυλογενετικό δέντρο.

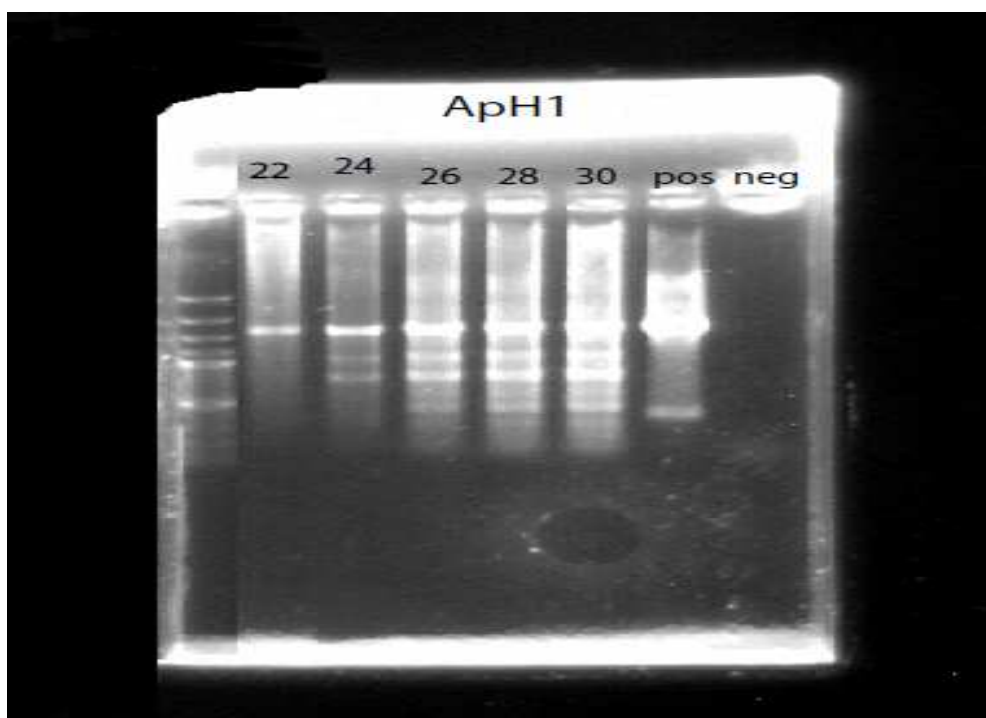
Η μέθοδος Neighbour Joining αποτελεί μια μέθοδο αποστάσεων. Κατά αυτήν τη μέθοδο, οι αποστάσεις εκφράζονται ως το ποσοστό των περιοχών που διαφέρουν ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες σε μια πολλαπλή ευθυγράμμιση. Αποτελεί μια αλγοριθμική μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται υπολογισμοί που περιλαμβάνουν το χειρισμό μιας μήτρας αποστάσεων που προκύπτει από τις πολλαπλές ευθυγραμμίσεις. Κάθε φορά που ξεκινάει μια ευθυγράμμιση υπολογίζεται για κάθε ζεύγος αλληλουχιών η απόσταση ή το ποσοστό των διαφορών και καταγράφονται τα στοιχεία στη μήτρα των αποστάσεων (Hall 2001).

Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε έχει τη μορφή φυλλογράμματος. Σε ένα φυλλόγραμμα, όλοι οι απόγονοι ενός κοινού προγόνου που απεικονίζεται με έναν κόμβο ανήκουν στον ίδιο κλάδο ή στην ίδια μονοφυλετική ομάδα. Το φυλόγραμμα

δίνει πληροφορίες και για τη σειρά των κλάδων, αλλά και για τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των διάφορων ομάδων.

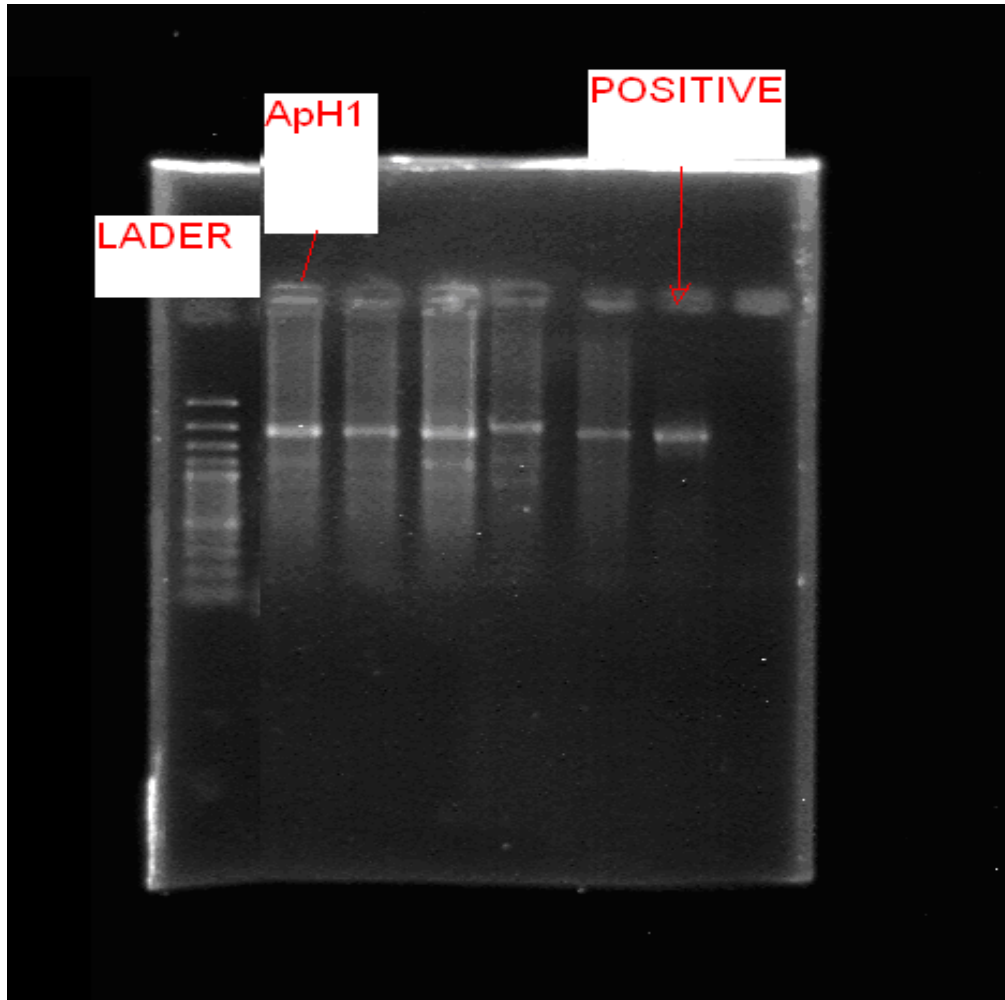
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε όλα τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν οι κωδικοί που αναφέρονται και στην παράγραφο 2.4 (Aph1 και Arm1). Στην Εικόνα 5 παρατηρούμε ότι στον πρώτο διάδρομο βρίσκεται ο μοριακός δείκτης και στη συνέχεια είναι τοποθετημένα τα δείγματα από την απομόνωση του DNA, όπου έχει πραγματοποιηθεί PCR σε διαφορετικούς κύκλους (22, 24, 26, 28, 30). Στους δύο τελευταίους βρίσκονται τοποθετημένοι, ο μάρτυρας με το (+) DNA από *E.coli* και ο μάρτυρας με το (-) DNA. Το συμπέρασμα που προέκυψε από τη βελτιστοποίηση των κύκλων από 30 σε 22 είναι ότι βακτηριακό DNA εντοπίζεται ακόμη και στους 22 κύκλους, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της κλωνοποίησης.

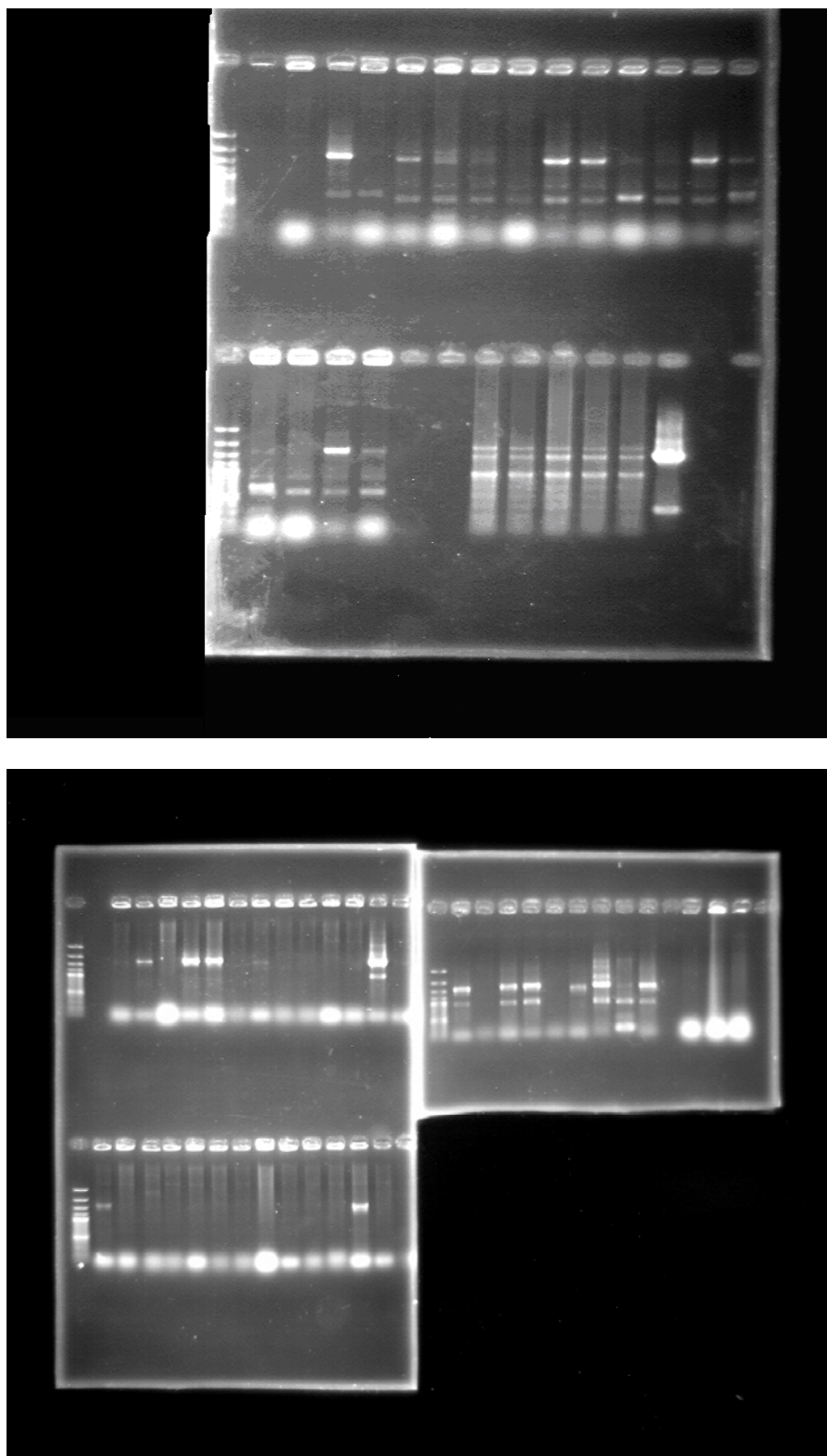


**Εικόνα 5.** Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης από την PCR (GM3 GM4) στο δείγμα Aph1. Στο διάδρομο 1 είναι το ladder, στο διάδρομο 2, 3, 4, 5, 6 είναι το δείγμα Aph1 και στους διαδρόμους 7 και 8 είναι το positive και το negative αντίστοιχα.

Αφού εντοπίστηκε ο ελάχιστος αριθμός των κύκλων PCR, στους οποίους υπήρχε το επιθυμητό προϊόν, προχωρήσαμε στον καθαρισμό των προϊόντων, ώστε να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η κλωνοποίηση.



**Εικόνα 6.** Αποτελέσματα την ηλεκτροφόρηση από την PCR μετά την βελτιστοποίηση των κύκλων στο δείγμα Aph1.



**Εικόνα 7.** Έλεγχος των αποικιών των κλώνων με την πραγματοποίηση της PCR στο δείγμα ApH1 και Apm1 αντίστοιχα.

Όταν έγινε η αναγνώριση των αλληλουχιών οι φυλότυποι των βακτηρίων που προέκυψαν ταξινομήθηκαν σε δύο συγκεντρωτικούς πίνακες (Πιν. 5 και 6). Στο δείγμα από το μεσέντερο της καραβίδας εντοπίστηκαν αντιπρόσωποι από τα υπό-φυλα των β-, γ- και δ- Proteobacteria καθώς και από τα φύλα των Bacteroidetes, Tenericutes και Actinobacteria, με τους αντιπροσώπους των γ- και δ- Proteobacteria να επικρατούν σε ποσοστά 38,8 και 22,1 % αντίστοιχα (Πίνακας 5). Στο δείγμα από το οπισθέντερο εντοπίστηκαν αντιπρόσωποι από τα υπό-φυλα των α-, δ- και ε- Proteobacteria καθώς και από τα φύλα των Bacteroidetes και Spirochaetes, με τους αντιπροσώπους των δ- και α- Proteobacteria να επικρατούν σε ποσοστά 50% και 25% αντίστοιχα (Πίνακας 6 ).

Από τις αλληλουχίες που προέκυψαν και με τη διαδικασία που περιγράφεται μεθοδολογία κατασκευάστηκαν τα δέντρα φυλοτύπων που φαίνονται παρακάτω.



Πίνακας 5. Κοντινότεροι συγγενείς φυλότυποι του μεσεντέρου.

Συγγενείς φυλότυποι		% ομοιότητα	Συχνότητα	Συστηματική κατάταξη
<b>Apm1-1</b> (1/3/2/35/33)	1. <i>Vibrio tapetis</i> strain IS1 (GQ260163)	99%	27,7%	γ- Proteobacteria
	2. <i>Vibrio tapetis</i> strain B8.3 (GQ260162)	99%		
<b>Apm1-6</b> (5/6/10)	1. Uncultured <i>Desulfobulbaceae</i> bacterium (gb FJ517087)	94%	16,6%	δ- Proteobacteria
	2. <i>Desulfobacterium catecholicum</i> strain NZva20(NR_028895)	94%		
<b>Apm1-30</b> (13/30)	1. <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> YB-29 (AY683476)	92%	11,1%	Bacteroidetes
	2. Bacterium K2-70 (AY345404)	92%		
<b>Apm1-8</b> (8/21)	1. <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (FM954972)	99%	11,1%	γ- Proteobacteria
	2. <i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnD (EU091328)	99%		
<b>Apm1-12</b>	1. Uncultured bacterium clone Se3-206	99%	5,5%	δ- Proteobacteria
	2. <i>Desulfatiferula olefinivorans</i> strain LM2801	88%		

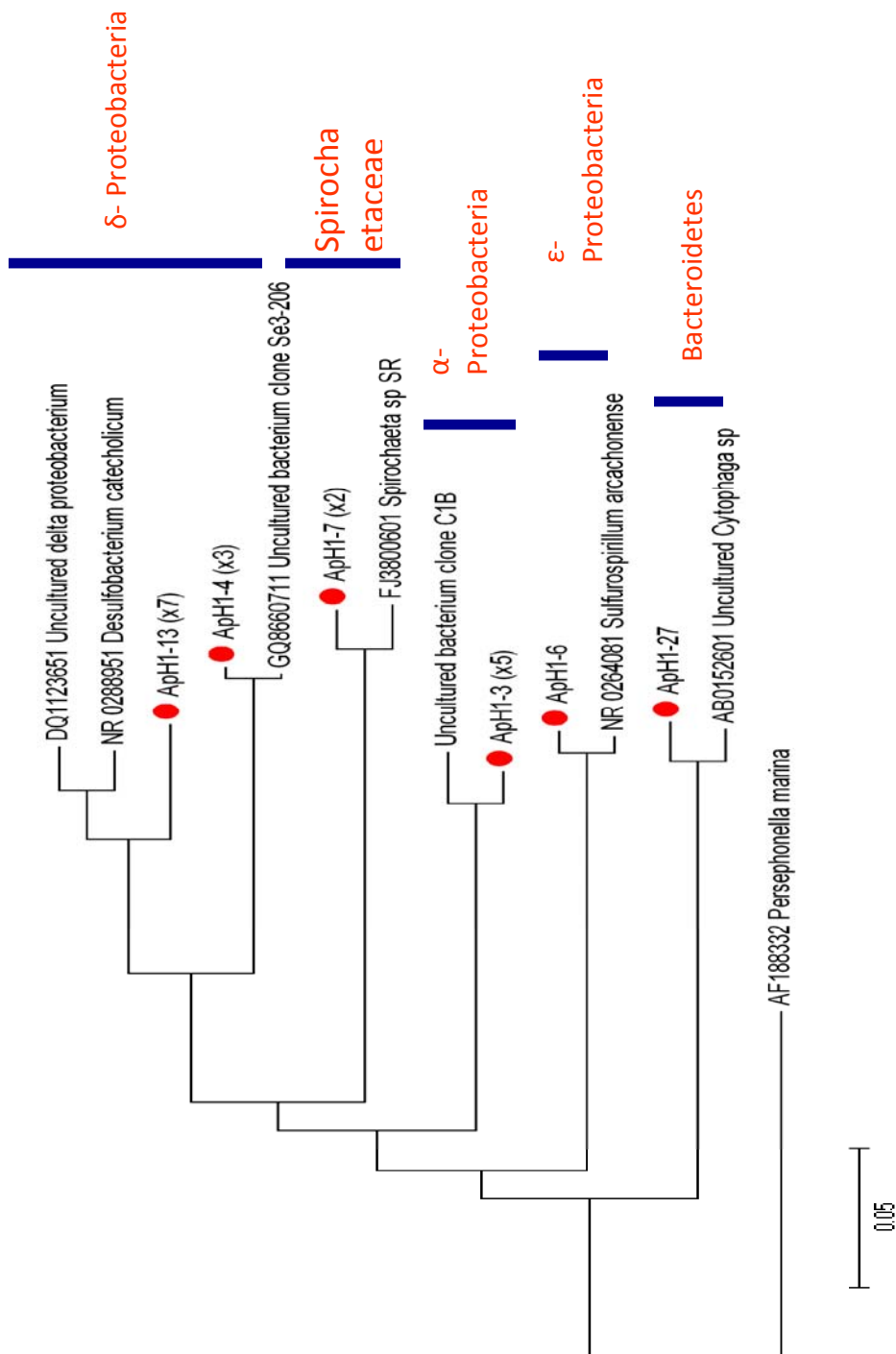
(DQ826724.1)				
<b>Apm1-4</b>	1. Uncultured bacterium clone AKIW598 (DQ129259)	92%	5,5%	$\beta$ -Proteobacteria
	2. Neisseriaceae bacterium Lie4-3 (GU199451)	91%		
<b>Apm1-19</b>	1. Uncultured bacterium clone Se3-204 (GQ866067)	99%	5,5%	Mollicutes
	2. <i>Mycoplasma cottewii</i> strain VIS (U67945)	87%		
<b>Apm1-25</b>	1. Uncultured bacterium clone SC38 (GU293201)	92%	5,5%	Mollicutes
	2. <i>Candidatus Hepatoplasma crinochetorum</i> clone 59 (AY500250)	86%		
<b>Apm1-26</b>	1. Uncultured bacterium clone Se3-204 (GQ866067)	85%	5,5%	Mollicutes
	2. <i>Mycoplasma</i> sp. (EU714239)	83%		

<b>Apm1-29</b>	1. Uncultured bacterium clone EV818CFSSAHH49 (DQ336995)	99%	5,5%	Actinobacteria
	2. <i>Propionibacterium acnes</i> (AM157438)	99%		

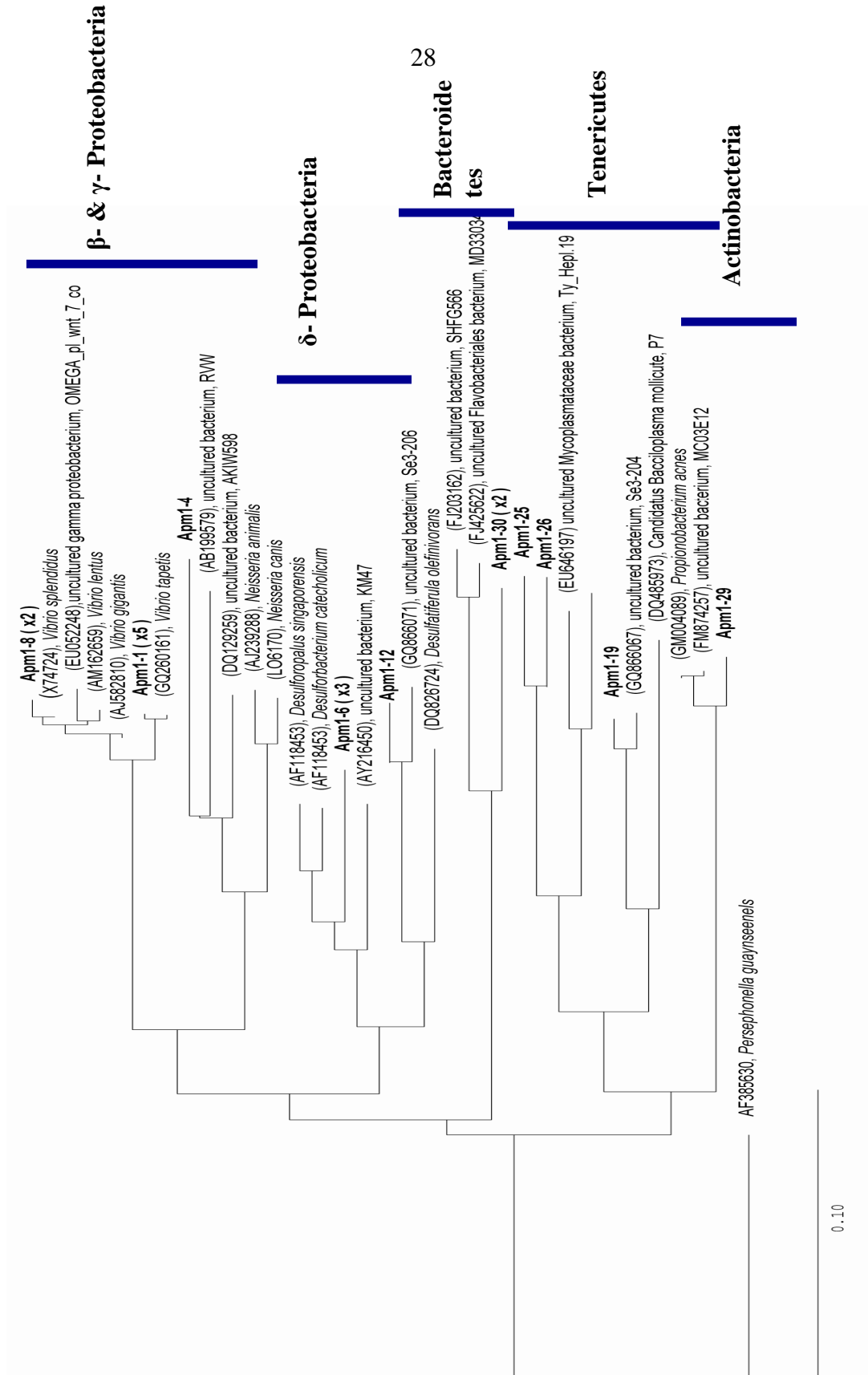
Πίνακας 6. Κοντινότεροι συγγενείς των φυλοτύπων του οπισθέντερου.

	Συγγενείς φυλότυποι	%ομοιότητα	Συχνότητα	Συστηματική κατάταξη
<b>ApH1-13</b> (2/8/11/13/23/21/28)	1. Uncultured delta proteobacterium (DQ112365)	91%	35%	δ- Proteobacteria
	2. <i>Desulfobacterium catecholicum</i> (AJ237602)	90%		
<b>ApH1- 3</b> (3/5/10/12/20)	1. Uncultured bacterium clone C1B (DQ856501)	96%	25%	α- Proteobacteria
	2. <i>Kiloniella laminariae</i> (AM749667)	87%		
<b>ApH1-4 (4/17/19)</b>	1. Uncultured bacterium clone Se3-206 (GQ866071)	99%	15%	δ- Proteobacteria
	2. <i>Desulfatiferula olefinivorans</i> (DQ826724)	89%		
<b>ApH1-7</b> (7/9)	1. <i>Spirochaeta</i> sp. SR (FJ380060)	92%	10%	Spirochaetaceae
	2. Uncultured bacterium clone E7_10.1_1 (FJ717268)	92%		
<b>ApH1-6</b>	1. Uncultured bacterium clone C2_10.2_1 (FJ717081)	98%	5%	ε-

<b>ApH1-24</b>	2.	<i>Sulfurospirillum arcachonense</i> (Y11561)	97%		Proteobacteria
	1.	Uncultured Cytophagales bacterium clone CD4B12 (AY038511)	90%		
				5%	Bacteroidetes
	2.	Uncultured bacterium clone SGUS1261 (FJ202774)	90%		
<b>ApH1-27</b>	1.	Uncultured <i>Cytophaga</i> sp. (AB015260)	94%		
	2.	Bacterium enrichment culture clone EB24.11 (EU573101)	93%	5%	Bacteroidetes



**Εικόνα 8.** Φυλογενετικό δέντρο των φυλοτύπων των δειγμάτων του οπισθέντερου με τη μέθοδο neighbour-joining όπως καθορίζεται από την ανάλυση αποστάσεων Jukes-Cantor. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις είναι αριθμοί καταχώρησης της GenBank. Οι φυλότυποι που βρέθηκαν απεικονίζονται με κόκκινο κύκλο και στις παρενθέσεις η συχνότητα εμφάνισης.



**Εικόνα 9.** Φυλογενετικό δέντρο των φυλοτύπων των δειγμάτων του μεσεντέρου στη μέθοδο neighbour-joining όπως καθορίζεται από την ανάλυση αποστάσεων Jukes-Cantor. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις είναι αριθμοί καταχώρησης της GenBank. Οι φυλότυποι που βρέθηκαν απεικονίζονται με έντονα γράμματα και στις παρενθέσεις η συχνότητα εμφάνισης.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η βακτηριακή ποικιλότητα του πεπτικού συστήματος της καραβίδας *Nephrops norvegicus*. Μελετήθηκε το μεσέντερο και το οπισθέντερο του *N. norvegicus*. Στα δύο τμήματα του εντέρου παρατηρήθηκαν αντιπρόσωποι από σχεδόν όλα τα υπό-φύλα των Proteobacteria, αλλά και από άλλα βακτηριακά φύλα. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν α, β, γ, και δ- Proteobacteria και αντιπρόσωποι των φύλων Bacteroidetes, Mollicutes, Actinobacteria. Ωστόσο, για να θεωρηθεί ότι ένας φυλότυπος ανήκει στο ίδιο είδος με κάποιον άλλο, το ποσοστό της ομοιότητας των αλληλουχιών τους πρέπει να είναι πάνω από 97% και να ανήκουν στο ίδιο γένος, όταν το ποσοστό ομοιότητας ξεπερνά το 90% (Stackenbrand & Goebel 1994).

Οι αντιπρόσωποι των γ-Proteobacteria που εντοπίστηκαν στο μεσέντερο της καραβίδας παρουσίασαν ως κοντινότερους συγγενείς (99%) αντιπροσώπους του γένους *Vibrio* και πιο συγκεκριμένα των ειδών *Vibrio splendidus* και *Vibrio tapetis*. Το γένος *Vibrio* βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στο υδάτινο περιβάλλον, όπως για παράδειγμα στις εκβολές των ποταμών, στα παράκτια νερά και στα ιζήματα (Barbieri *et al.* 1999). Έχουν γίνει πολλές μελέτες που αποδεικνύουν ότι βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στους θαλάσσιους οργανισμούς όπως τα κοράλια, τα μαλάκια, τα φύκη, τους σπόγγους, τις γαρίδες και το ζωοπλαγκτόν (Arias *et al.* 1995, Gomez-Gil *et al.* 1998, Heidelberg *et al.* 2002). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το γένος *Vibrio* παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής των θρεπτικών στο θαλάσσιο περιβάλλον (Sherr & Sherr 2000, Sherr & Sherr 2002). Μια από τις ικανότητες του γένους είναι να διασπά την χιτίνη η οποία αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες πηγές αμινοσακχάρων στον ωκεανό (Cottrell & Kirchman 2000, Riemann & Azam 2002). Μερικά είδη *Vibrio* είναι σε θέση να διασπούν



αρωματικούς υδρογονάνθρακες των ρυπασμένων οικοσυστημάτων και είναι σημαντικό να τονισθεί ότι μερικά από αυτά είναι παραγωγοί αντιβιοτικών (Thompson *et al.* 2004). Το είδος *Vibrio tapetis* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1990 στην Landeda (Γαλλία) και καθορίστηκε ως κύριο υπεύθυνο για τη νόσο των κελυφών στα μαλάκια, όπως είναι το *Ruditapes philippinarum*. Αν και το είδος αυτό είναι γνωστό για τη νόσο που προκαλεί στα δίθυρα μαλάκια, έχει απομονωθεί και σε εκτρεφόμενα ψάρια (Lopez *et al.* 2010). Το *V. tapetis* είναι δυνητικώς αναερόβιος μικροοργανισμός και είναι Gram αρνητικό βακτήριο (Borrego *et al.* 1996). Το είδος *Vibrio splendidus* είναι δυνητικώς αναερόβιος μικροοργανισμός και έχει την δυνατότητα ζυμωτικού μεταβολισμού των υδατανθράκων και παράλληλα να ακολουθήσει τον οξειδωτικό μεταβολισμό απουσία οξυγόνου χρησιμοποιώντας ως δέκτες ηλεκτρονίων νιτρικά. Το *V. splendidus* έχει αποδειχθεί ότι είναι συμβιώτης διθύρων και ότι μπορεί με επιτυχία να επικρατήσει και να διαβιώσει στο πεπτικό σύστημα του ξενιστή και του περιβάλλοντος νερού (Pujalte *et al.* 1999). Το γένος *Vibrio* αν και εμφανίζεται πολύ συχνά στο πεπτικό σύστημα πολλών ζώων, δε σημαίνει κατ' ανάγκη ότι είναι και παθογόνο. Μεταξύ της σχέσης συμβίωσης και παρασιτισμού υπάρχει μια λεπτή ισορροπία, που σε καταστάσεις πίεσης η συμβιωτική σχέση μπορεί να μετατραπεί σε παρασιτική. Η ύπαρξη των συγκεκριμένων φυλοτύπων στα δείγματα μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη συμβιωτικών μικροοργανισμών στο μεσέντερο της караβίδας. Ωστόσο δε μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός ότι αυτά βρέθηκαν περιστασιακά ή τυχαία στο έντερο της караβίδας.

Πολλοί από τους φυλότυπους που βρέθηκαν και στα δύο τμήματα του εντέρου που εξετάστηκαν φαίνεται ότι ανήκουν στο γένος *Desulfobacterium*, ενώ άλλοι είναι πολύ κοντινοί με ακαλλιέργητα δ-Proteobacteria και με το γένος *Desulfatiferula*. Διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη ότι όλοι οι φυλότυποι ανήκουν στην ομάδα δ-

Proteobacteria, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των θεικοαναγωγικών βακτηρίων. Τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα παραγωγής ενέργειας χρησιμοποιώντας τα θειικά ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) ως δείκτες ηλεκτρονίων. Τα θειικά με αυτό τον τρόπο ανάγονται σε θειώδη και στη συνέχεια σε υδρόθειο ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Έτσι λοιπόν, τα θειικά ανάγονται σε θειώδη και έπειτα σε υδρόθειο. Οι δότες ηλεκτρονίων είναι σάκχαρα, οργανικά οξέα, αλκοόλες και αμινοξέα. Μερικοί από τους αντιπροσώπους των θεικοαναγωγικών βακτηρίων έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν το σίδηρο (Fe) ως δέκτη ηλεκτρονίων, αλλά δεν έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας μόνο το σίδηρο (Fe) ως δέκτη ηλεκτρονίων (Lovley 2004). Τα δ-Proteobacteria είναι πολύ κοινά στο ίζημα, συνεπώς η εμφάνιση των θεικοαναγωγικών βακτηρίων στο έντερο της καραβίδας είναι πολύ πιθανή μιας και η καραβίδα *Nephrops norvegicus* είναι ένα βενθικό είδος που ζει και τρέφεται σε λαγούμια στον πυθμένα της θάλασσας.

Ένας από τους φυλότυπους που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχει ενοπισθεί στο μεσέντερο του *N. norvegicus* είναι το ακαλλιέργητο βακτήριο Se3-204 που ανήκει στα Mollicutes. Στο μεσέντερο, έχουν βρεθεί και άλλοι συγγενικοί φυλότυποι που ανήκουν στους Mollicutes, όμως παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά ομοιότητας με το δείγμα. Άλλοι εκπρόσωποι της ομάδας αυτής έχουν βρεθεί στο έντερο της οικογένειας Lumbricidae (Nechitaylo *et al.* 2009) και στο ισόποδο *Porcellio scaber* (Kostanjsek *et al.* 2007). Ωστόσο, έχει μεγάλη σημασία να αναφερθεί ότι ο φυλότυπος Se3-204 έχει βρεθεί ξανά σε δείγματα που ήταν από το έντερο του *N. norvegicus* και είχαν αλιευθεί από τον Παγασητικό Κόλπο το 2007 (Meziti *et al.* 2010). Μερικά μυκοπλάσματα, τα οποία ανήκουν στα Mollicutes, είναι γνωστά παθογόνα, αλλά πολλά είδη φαίνεται ότι είναι μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας των ξενιστών τους και φαίνεται ότι δεν έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στους ξενιστές τους. Πολλά μέλη των

Mollicutes είναι ενδοκυτταρικά συμβιωτικά, με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό να διαθέτουν το μικρότερο γονιδίωμα από τους μικροοργανισμούς. Έχουν την ικανότητα να αυξάνονται αυτόνομα, ενώ παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της εξαιρετικά απλής κυτταρικής δομής και των μικρών γονιδιωμάτων τους (Razin *et al.* 1998). Ο συγκεκριμένος φυλότυπος Se3-204 έχει εντοπισθεί δύο φορές σε δείγματα από ζώα που αλιεύθηκαν από τον Παγασητικό Κόλπο και πιθανώς να σχετίζεται με λειτουργίες του πεπτικού συστήματος που χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής.

Σε μερικά από τα δείγματα, στο οπισθέντερο, βρέθηκε το γένος *Spirochaeta* και εμφανίστηκε σε συχνότητα 5,3%. Το γένος *Spirochaeta* περιλαμβάνει μη συμβιωτικές, ανερόβιες και προαιρετικά αναερόβιες σπειροχαίτες. Το γένος *Spirochaeta* συναντάται συνήθως στο ίζημα των λιμνών και των θαλασσών και αυτός μπορεί να είναι ο λόγος που εμφανίζεται στο έντερο της καραβίδας (Madigan *et al.* 2006).

Στο μεσέντερο του *N. norvegicus* βρέθηκε το είδος *Propionibacterium acnes*, το οποίο ανήκει στα Actinobacteria. Το *Propionibacterium* είναι αναερόβιο βακτήριο. Το είδος *Propionibacterium acnes* έχει βρεθεί και στο ανώτερο τμήμα του πεπτικού συστήματος του αχινού αλλά και στο στομάχι των ασκιδίων (Meziti *et al.* 2007). Αποτελεί παθογόνο μικροοργανισμό για τον άνθρωπο, αφού έχει εντοπισθεί σε πολλούς ασθενείς με αναπνευστικά προβλήματα (Coenye *et al.* 2002). Επίσης, έχει βρεθεί ως συμβιώτης στο πεπτικό σύστημα του κόκκινου ελαφιού και του αποδόθηκαν λιπολυτικές ιδιότητες (Jarvis *et al.* 1998). Ωστόσο δεν έχει βρεθεί ακόμα να συμβιώνει με ασπόνδυλα.

Στο οπισθέντερο του *N. norvegicus* εντοπίστηκε και το γένος *Cytophaga* που ανήκει στα Bacteroidetes. Το γένος *Cytophaga* είναι δυνητικώς αναερόβιο βακτήριο και ευθύνεται για το μεγαλύτερο μέρος των διαδικασιών διάσπασης της κυτταρίνης που

λαμβάνουν χώρα στη φύση από προκαρυώτες. Ορισμένα είδη είναι παθογόνα για τα ψάρια και μπορούν να δημιουργήσουν σοβαρά προβλήματα. Το γένος *Cytophaga* είναι πολύ κοινό στο θαλάσσιο περιβάλλον και συγκεκριμένα σε μεγάλα βάθη. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι το *Cytophaga* εντοπίστηκε στα δείγματα μας λόγω της παρουσίας του σε δείγματα ζωντανών οργανισμών, και πιθανώς να μη διαδραματίζει κάποιο συγκεκριμένο ρόλο ως συμβιώτης των καραβίδων (Li *et al.* 1999).

Στο οπισθέντερο του *N. norvegicus* επίσης βρέθηκαν α-Proteobacteria όπου εμφανίζουν χαμηλό ποσοστό ομοιότητας με το δείγμα. Τα α-Proteobacteria είναι ένα από τα πέντε υπό-φυλα των Proteobacteria και έχουν την ικανότητα να ζουν σε ολιγοτροφικό περιβάλλον (Kwon *et al.* 2005). Έχει αναφερθεί ότι τα α-Proteobacteria είναι πολύ κοινά στην υδάτινη στήλη και ακόμα έχουν εντοπισθεί στο έντερο κάβουρα (*Eriocheir sinensis*), αλλά η ακριβή τους λειτουργία δεν είναι ακόμα γνωστή (Li *et al.* 2007).

Συμπερασματικά, στο μεσέντερο του *N. norvegicus*, τα γ-Proteobacteria που εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα πιθανότατα να αποτελούν συμβιώτες του πεπτικού συστήματος της καραβίδας. Πιθανότατα, στο μεσέντερο, τα γ-Proteobacteria να βοηθούν στην πέψη της τροφής με τα ένζυμα που διαθέτουν. Σύμφωνα με τους Lau *et al.* (2002), τα γ-Proteobacteria είναι πολύ κοινά βακτήρια στο μεσέντερο της καραβίδας, όπου εκεί γίνεται η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, και πιθανώς προσφέρουν στις λειτουργίες της καραβίδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αυτό το τμήμα του εντέρου βρέθηκε και το ακαλλιέργητο βακτήριο Se3-204 που έχει εντοπισθεί πάλι στο έντερο του *N. norvegicus* που έχει αλιευθεί από τον Παγασητικό Κόλπο (Meziti *et al.* 2010). Το ακαλλιέργητο βακτήριο Se3-204 ανήκει στα Mollicutes, όπου ανήκουν το *Mycoplasma* που είναι παθογόνο, και βρίσκεται αναγκαστικά συμβιωτικά μαζί με

άλλους οργανισμούς. Τους πιθανούς ρόλους του, ωστόσο, δεν τους γνωρίζουμε ακόμα. Παρατηρούμε ότι εμφανίζεται μόνο στο μεσέντερο της καραβίδας, ενώ στο οπισθέντερο δεν έχει εντοπιστεί κανένας αντιπρόσωπος από το φύλο Tenericutes. Στο οπισθέντερο, οι φυλότυποι που κυριάρχησαν ήταν τα δ-Proteobacteria με τα μεγαλύτερα ποσοστά συχνότητας. Τα δ-Proteobacteria βοηθούν στην αποικοδόμηση, αλλά και στην παραγωγή πλούσιων σε ενέργεια ουσιών μέσω του χημειοετερότροφου μεταβολισμού. Τα δ-Proteobacteria είναι πολύ κοινά στο ίζημα, παρατηρούμε όμως ότι καταφέρνουν να επιβιώνουν και στα δύο τμήματα του εντέρου και να κυριαρχούν στο οπισθέντερο. Ωστόσο δεν έχουμε αρκετές πληροφορίες για τον ακριβή τους ρόλο στο οπισθέντερο της καραβίδας (Lau *et al.* 2002). Τα βακτήρια που παρατηρούμε στο οπισθέντερο δεν ανταγωνίζονται με τον ξενιστή τους. Παρόλα αυτά βρέθηκαν και φυλότυποι με μικρότερα ποσοστά που δεν πρέπει να παραβλεφθούν. Στους Ravenschlag *et al.* (1999) αναφέρεται ότι, πολλές φορές, συμβιώτες που βρίσκονται σε μικρές ποσότητες μέσα σε ξενιστές απεικονίζουν την ευελιξία διαφορεικής ανάπτυξης των ποικίλων συμβιωτών ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abello P., Abella A., Adamidou A., Jukic-Peladic S., Maiorano P., Spedicato M.T. (2002) Geographical patterns in abundance and population structure of *Nephrops norvegicus* and *Parpenaeus longirostris* (Crustacea:Decapoda) along the European Mediterranean coasts. *Scientia Marina*, 66:125-141.
- Arias C.R., Garay E., Aznar R. (1995) Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:3476–3478.
- Baker J.H., Bradnam L.A. (1976) The role of bacteria in the nutrition of aquatic detritivores. *Oecologia (Berl)*, 24:95-104.
- Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Matarrese P., Casiere A., Katouli M., Kuhn I., Mollby R., Bruscolini F., Donelli G. (1999) Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:2748–2753.
- Bernard P., Gabant P., Bahassi E.M., Couturier M. (1994) Positive selection vectors using the F-Plasmid ccdB Killer Gene. *Gene*, 148:71-74.
- Bjornsson B., Dombaxe M. (2004) Quality of *Nephrops* as food for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) with possible implications for fisheries management. *ICES Journal of Marine Science*, 61:983-991.
- Borrego J.J., Castro D., Luque A., Paillard C., Garcia P.M.T., Ventosa A. (1996) *Vibrio tapetis* sp. nov., the Causative Agent of the Brown Ring Disease Affecting Cultured Clams. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 480-484.
- Cardinale M., Brusetti L., Quatrini P., Borin S., Puglia A.M., Rizzi A., Zanardini E., Sorlini C., Corselli C., Daffonchio D. (2004) Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:6147-6156.
- Coenye T., Goris J., Spilker T., Vandamme P., LiPuma J.J. (2002) Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol.*, 40(6):2062-9.
- Conklin D.E. (1995) Digestive Physiology and Nutrition (Chapter 16) Biology of the lobster *Hommarus americanus* edited by J R Factor, Academic press, New York, pp443.
- Cottrell M.T., Kirchman D.L. (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:5116–5122.
- Cristo M., Cartes J.E. (1998) A comparative study of the feeding ecology of *Nephrops norvegicus* (L) in the bathyal Mediterranean and adjacent Atlantic. *Scientia Marina*, 62:81-90.
- Crnković D. (1965) Ispitivanje ekologije i mogućnosti racionalnog unaprijeđenja eksploatacije raka *Nephrops norvegicus* (L) u kanalskom području sjeveroistočnog Jadrana. Disertacija, PMF Sveučilišta u Zagrebu.
- Dempsey A.C., Kitting C.L., Rosson R.A. (1989) Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana*, 56:266-278.

- Dimijian G.G. (2000) Evolving together: the biology of symbiosis, part I. BUMC Proceedings, 13:217-226.
- Donelli G. (1999) Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. Appl. Environ. Microbiol., 65:2748–2753.
- Farmer A.S. (1975) Synopsis of biological data on the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). FAO Fisheries Synopses, 112:1-9.
- Fenchel T. (1970) Studies on the decomposition of organic detritus derived from the turtle grass *Thalassia testudinum*. Limnol Oceanogr, 51:14-20.
- Fisher W., Schneider M., Bauchot M.L. (eds.) (1987) Fishes FAO didentification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Vol. I – II., Rome, FAO. 1-2: 760 p.
- Giebel J., Binder A., Kirchhoff H. (1990) Isolation of Mycoplasma-Moatsii from the Intestine of Wild Norway Rats (*Rattus-Norvegicus*). Vet. Microbiol, 22:23-29.
- Gomez-Gil B., Roque A., Turnbull J.F., Tron-Mayen L. (1998) Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 163:1–9.
- Gramitto M.E. (1998) Molt pattern Identification through gastrolith examination on *Nephrops norvegicus* (L.) in the Mediterranean Sea. Scientia Marina, 62:17-23.
- Hall B.G. (2001) Phylogenetic trees made easy 1<sup>st</sup> edition, release, Sinauer associates, Inc-Publishers Sunderland, Massachusetts, USA.
- Harris R.P., Ulmestrand M. (2004) Discarding Norway lobster (*Nephrops norvegicus* L.) through low salinity layers mortality and damage seen in simulation experiments. ICES Journal of Marine Science, 61:127-139.
- Heidelberg J.F., Heidelberg K.B., Colwell R.R. (2002) Bacteria of the gamma-subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol., 68:5498–5507.
- Jarvis G.N., Strompl C., Moore E.R., Thiele J.H. (1998) Isolation and characterisation of obligately anaerobic, lipolytic bacteria from the rumen of red deer. Syst Appl Microbiol 21(1):135-43
- Kostanjsek, R., Strus J., Avgustin G. (2007) "Candidatus Bacilloplasma," a novel lineage of Mollicutes associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea : Isopoda). Appl. Environ. Microbiol. 73:5566-5573.
- Kwon K.K., Lee H.S., Yang S.H., Kim S.J. (2005) *Kordiimonas gwangyangensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from marine sediments that forms a distinct phyletic lineage (*Kordiimonadales* ord. nov.) in the 'Alphaproteobacteria'.
- Lau W.W.Y., Jumars P.A., Armbrust E.V. (2002) Genetic Diveristy of Attached Bacteria in the Hindgut of the Deposit Feeding Shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callinassa*) *californiensis* (Decapoda: Thalassinidae). Microbial Ecology, 43:455-466.
- Li K., Guan W., Wei G., Liu B., Xu J., Zhao L., Zhang Y. (2007) Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Journal of Applied Microbiology, 103:675–682.
- Li L., Kato C., Horikoshi K. (1999) Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench Mar. Biotechno., 1:391–400.

- Lovley D. (2004) Dissilatory Fe (III) and Mn (IV) Reducing Prokaryotes. In: m.Dworkin et al., eds., The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. 3<sup>rd</sup> edition, release, Springer- Verlag, New York.
- Lopez, J.R., Balboa S., Nípez S., de la Roca E., de la Herran R., Navas J.I. , Toranzo A.E. Romald J.L (2010) Characterization of *Vibrio tapetis* strains isolated from diseased cultured Wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau). Research in Veterinary Science, 1-7.
- Madigan T.M., Martinko M.J., Parker J. (2006) Brock Biology of microorganism, 10<sup>th</sup> edition, Pearson Prentice Hall, pp 502.
- Margulis L., (1981) Symbiosis in Cell Evolution. W.H. Freeman & Co Ltd, New York.
- Mayer L.M., Jumars P.A., Bock M.J., Vetter Y.A, Schmidt J.L. (2001) Two roads to sparagmos: Extracellular digestion of sedimentary food by bacterial inoculation versus deposit –feeding. In : Aller J.Y., Woodin S.A., Aller R.C. (eds): Organism-Sediment Interactions. The Belle W. Baruch Library in Marine Science 21:335-347.
- Mente E., Karapanagiotidis I., Logothetis P., Vafidis D., Malandrakis E., Neofitou N., Exadactylos A., Stratakis A. (2009) The reproductive cycle of Norway lobster. Journal of Zoology, 4:324-332.
- Meziti A., Kormas K. Ar., Pancucci-Papadopoulou M.A., Thessalou-Legaki M. (2007) Bacterial Phylotypes Associated with the Digestive Tract of the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* and the Ascidian *Microcosmus* sp. Russian Journal of Marine Biology, 33:84–91.
- Meziti A., Ramette A, Mente E., Kormas Ar.K. (2010) Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology, 1-31.
- Mezzanotte V., Prato N., Sgorbatii S., Citterio S. (2004) Analysis of microbiological characteristics of wastewater along the polishing sequence of treatment plant. Water Environment Research, 76:463-7.
- Nair S. (2004) Bacterial Associations: Antagonism to Symbiosis. Biological Oceanography Division, National Institute of Oceanography Dona Paula, Goa – 403 004.
- Nechitaylo T.Y., Timmis K.N., Golyshin P.N. (2009) 'Candidatus Lumbricincola', a novel lineage of uncultured Mollicutes from earthworms of family Lumbricidae. Environ. Microbiol, 11:1016-1026.
- Paracer S., Ahmadjian V. (2000) Symbiosis: an introduction to biological associations. 2<sup>nd</sup>., Oxford University Press, US:3.
- Pujalte M.J., Ortigosa M., Macian M.C., Caray E. (1999) Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. International Microbiology, 2:259-266.
- Ravenschlag K., Sahm K., Pernthaler J., Amann R. (1999) High bacterial diversity in Permanently cold marine sediments. Appl. and environ. Microbiol., 3982-3989.
- Razin S., Yogeve D., Naot Y. (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1094-+.
- Relini G., Bertrand J., Zamboni A. (eds.) (1999) Synthesis of the knowledge on bottom fishery resources in Central Mediterranean (Italy and Corsica). Biol. Mar. Medit., 6 (suppl. 1).



- Riemann L., Azam F. (2002) Widespread *N*-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:5554–5562.
- Sarda F., Valladares F.J. (1990) Gastric evacuation of different foods by *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) and estimation of soft tissue ingested, maximum food intake and cannibalism in captivity. *Marine Biology*, 104:25-30.
- Sherr E., Sherr B. (2000) Marine microbes: an overview, p. 13–46. *In* D. L. Kirchman (ed.), *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, London, United Kingdom.
- Sherr E.B., Sherr B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Leeuwenhoek*, 81:293–308.
- Smith C.J., Papadopoulou K.N. (2007) *Nephrops* fisheries in Hellas. State of Hellenic fisheries, Papaconstantinou C, Zenetos A., Vassilopoulou V. & Tserpes G. (eds), Athens: Hellenic Centre Marine Research, pp:452-466.
- Stackenbrand E., Goebel B.M. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 4846-849.
- Thompson F.L., Iida T., Swings J. (2004) Biodiversity of *Vibrios* microbiology and molecular biology reviews, 68: 403–431.
- Yonge C. M. (1924) Baxter Natural Science Scholar, University of studies on the comparative physiology of digestion. ii.—the mechanism of feeding, digestion, and assimilation in *Nephrops norvegicus* Edinburgh, pp 363-365.

### Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

FAO Fisheries and Agriculture Department: <http://www.fao.org/fishery/species/2647/en> (Πρόσβαση: 26/5/2010)

Hans Hillewaert (2006) *Nephrops norvegicus*  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nephrops\\_norvegicus.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nephrops_norvegicus.jpg) (Πρόσβαση: 26/5/2010)

## ABSTRACT

The molecular diversity of bacteria in the intestine of the *Nephrops norvegicus* was studied aiming at the investigation of the possible interaction of the lobster with its symbionts and its environment. *N. norvegicus* is a decapod crustacean of the *Nephropidae* family which is found in the east Atlantic Ocean, from Morocco to Norway and Iceland as well as in the Mediterranean Sea. Specimens of *N. norvegicus* were collected from the natural population living in Pagasitikos gulf. The lobster's intestine was divided into two parts, midgut and hindgut, and in each one of them a separate study of the symbionts was conducted. DNA from the intestine was isolated and then by using primers for Bacteria and with Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, the 16SrRNA genes were amplified. Afterwards, gene cloning was conducted and a library for each sample with different types of phylotypes was created. The resulting sequences were analyzed and compared with sequences in the data base GENBANK through the function BLAST aiming at the closest relative phylotypes to be found. Finally, the construction of the phylogenetic tree was made by using the MEGA4. In the sample of the midgut of the lobsters, representatives of the sub-phylum  $\beta$ -  $\gamma$ - and  $\delta$ - Proteobacteria as well as from Bacteroidetes, Tenericutes and Actinobacteria were found, with the representatives of  $\gamma$ - and  $\delta$ - Proteobacteria to prevail in percentages of 38.8 and 22.1% respectively.  $\gamma$ -Proteobacteria, which appear in a larger percentage (38.8%), are found in habitats such as the water column but also as symbionts in marine invertebrates. Moreover, it should be pointed out that in the midgut of the uncultivated bacterium Se3-204, belonging to Mollicutes, was found. The uncultivated bacterium Se3-204 had been found again in the past in lobster sample

fished in Pagasitikos Gulf. In the sample of the hindgut, representatives of the sub-phylum  $\alpha$ -,  $\delta$ - and  $\epsilon$ - Proteobacteria as well as Bacteroidetes and Spirochaetes were found, with representatives  $\delta$ - and  $\alpha$ - Proteobacteria to prevail in a percentage of 50% and 25% respectively. Contrary to the midgut, in the back end of it  $\delta$ -Proteobacteria is in a higher percentage (50%) comparing to the rest of the representatives. The presence of chemorganotrophic bacteria in the gut of the lobster may be involved in the organic matter and the provision of alternative carbon sources in the lobster.

**Keywords:** *N. norvegicus*, symbiosis, midgut, hindgut